

明細書

骨の再生方法

技術分野

本発明は、骨の再生方法に関する。より詳細には、本発明は、上皮系細胞の共存下に間葉系細胞を移植することにより骨を再生する方法に関する。本発明はさらに、上記方法により再生された骨を用いて患者を治療する方法に関する。

背景技術

骨折はあらゆる年齢層の人に発生し得る障害である上、長期の治癒期間を要する場合が多い。患者の日常生活に支障をきたすため、骨折を早期に治癒させることは、QOLの点からも重要な課題である。特に高齢者の骨折の場合、寝たきりになる可能性も高く、社会的にも経済的にも重要な問題となっている。

骨欠損としては、例えば、歯槽堤萎縮症、また、腫瘍、のう胞の摘出後に生じた骨欠損、更に外傷や先天性疾患による骨欠損（口蓋裂等）などが挙げられ、骨移植や骨延長、もしくは人工骨による治療がなされているが、必ずしも十分な効果をあげてはおらず、また、ドナーサイトの問題（患者の負担やリスク等）も残されている。骨折、骨欠損の治療に関しては、例えば、BMP、FGF、TGF- β などの骨形成促進因子の利用についての検討がなされているが、この様なペプチド性因子は生体内で速やかに代謝されて失活してしまうか、もしくは、至適濃度を維持することが困難なため、十分な治療効果を得られない場合が多い。更に、この因子類の安定性を改善する製剤等の検討もなされているものの、臨床での応用に満足できるものはまだ得られていない。

また、骨形成促進作用を示す低分子化合物、例えばプロスタグランジン類、ベンジルホスホン酸誘導体、フェノールスルホフタレン誘導体、ビタミンD誘導体類などについても検討がなされているが、副作用を有していたり、臨床的に骨折や骨欠損の治療を行うためには未だ不十分な能力しか有していないのが現状であ

る。

これらの問題点を根本的に解決するために、近年、同種または自家骨由来の細胞を用いた治療の検討がなされている。すなわち、骨形成の中心的役割を担う骨芽細胞や、骨髄由来の未分化間葉系幹細胞を骨芽細胞に分化させたものを、適当な担体と共に骨折部位または骨欠損部位などに移植する技術が試みられている (Ohgushi et al., J. Biomed. Mat. Res. (48), 913-927, 1999)。同技術は、副作用の少ない有効な技術として期待されるが、形成される骨量や治癒期間等の点で未だ不十分な技術である。

通常、上記した通り、細胞を用いて骨を形成する場合、組織を形成する芽細胞、もしくはその前駆細胞又は幹細胞等の間葉系細胞のみを用いており、上皮系細胞を共存させることにより骨の形成を著しく促進させる技術については、これまで全く知られていなかった。

発明の開示

本発明は上記した従来技術の問題点を解消することを解決すべき課題とした。即ち、本発明は、骨を効果的に再生する方法を提供すること、より具体的には、骨の欠損又は損傷を有する患者を治療することを可能にする骨の再生方法を提供することを解決すべき課題とした。さらに本発明は、再生した骨を用いて骨の欠損又は損傷を有する患者を治療する方法を提供することを解決すべき課題とした。

本発明者らは、上記課題を解決するために鋭意検討した結果、上皮系細胞の共存下に間葉系細胞を培養及び／又は移植することにより、間葉系細胞の分化誘導が促進され、骨の再生を促進できることを見出し、本発明を完成するに至った。

即ち、本発明によれば、上皮系細胞の共存下に間葉系細胞を培養することを含む、骨の再生方法が提供される。好ましくは、担体上で、上皮系細胞の共存下に間葉系細胞を培養する。

本発明の別の態様によれば、上皮系細胞の共存下に間葉系細胞を動物に移植し、該移植動物の体内で骨を再生させることを含む、骨の再生方法が提供される。好

ましくは、上皮系細胞の共存下に間葉系細胞を担体と一緒に動物に移植し、該移植動物の体内で骨を再生させる。

好ましくは、上皮系の細胞として、内エナメル上皮細胞、外エナメル上皮細胞、エナメル髓細胞、中間層細胞、エナメル芽細胞、マラッセの上皮遺残細胞、口腔粘膜上皮細胞、上皮細胞、表皮細胞又はこれらの前駆細胞を使用することができ、間葉系細胞として、象牙芽細胞、歯髓細胞、歯乳頭細胞、歯嚢細胞、セメント芽細胞、骨芽細胞又はこれらの前駆細胞、又は間葉系の幹細胞を使用することができる。好ましくは、再生する骨は、顎骨もしくは歯槽骨である。

本発明のさらに別の態様によれば、上記した本発明の方法により再生された骨が提供される。本発明のさらに別の態様によれば、上記した本発明の方法により再生した骨を、骨の欠損又は損傷を有する患者に移植することを含む、治療方法が提供される。本発明のさらに別の態様によれば、(1) 内エナメル上皮細胞、外エナメル上皮細胞、エナメル髓細胞、中間層細胞、エナメル芽細胞、マラッセの上皮遺残細胞、口腔粘膜上皮細胞、上皮細胞、表皮細胞又はこれらの前駆細胞から選択される上皮系細胞；(2) 象牙芽細胞、歯髓細胞、歯乳頭細胞、歯嚢細胞、セメント芽細胞、骨芽細胞又はこれらの前駆細胞あるいは間葉系の幹細胞から選択される間葉系細胞；及び(3) 担体を含む、骨再生用組成物が提供される。

図面の簡単な説明

図1は、歯胚間葉系細胞のみを担体に播種して移植し、11週間後に取り出した移植体を示す。

図2は、歯胚間葉系細胞のみを担体に播種して移植し、11週間後に取り出した移植体の組織像（ヘマトキシリン－エオジン染色）を示す。

図3は、培養した歯胚間葉系細胞のみを担体に播種して移植し、4週間後に取り出した移植体の組織像（ヘマトキシリン－エオジン染色）を示す。

図4は、歯胚上皮系細胞と歯胚間葉系細胞の混合物を担体に播種して移植し、4週間後に取り出した移植体を示す。

図5は、歯胚上皮系細胞と歯胚間葉系細胞の混合物を担体に播種して移植し、4週間後に取り出した移植体の組織像(ヘマトキシリンーエオジン染色)を示す。

図6は、歯胚上皮系細胞及び歯胚間葉系細胞を播き分けて担体に播種して移植し、4週間後に取り出した移植体を示す。

図7は、歯胚上皮系細胞及び歯胚間葉系細胞を播き分けて担体に播種して移植し、4週間後に取り出した移植体の組織像(ヘマトキシリンーエオジン染色)を示す。

図8は、歯胚間葉系細胞を担体に播種したものを口腔粘膜上皮細胞シートで包んで移植し、4週間後に取り出した移植体を示す。

図9は、歯胚間葉系細胞を担体に播種したものを口腔粘膜上皮細胞シートで包んで移植し、4週間後に取り出した移植体の組織像(ヘマトキシリンーエオジン染色)を示す。

図10は、培養歯胚間葉系細胞と表皮細胞の混合物を担体に播種して移植し、4週間後に取り出した移植体を示す。

図11は、培養歯胚間葉系細胞と表皮細胞の混合物を担体に播種して移植し、4週間後に取り出した移植体の組織像(ヘマトキシリンーエオジン染色)を示す。

発明を実施するための最良の形態

以下、本発明の実施の形態について詳細に説明する。本発明による骨の再生方法は、上皮系細胞の共存下に間葉系細胞を培養、及び／又は移植動物に移植することにより、骨を再生させることを特徴とするものである。

本発明で用いる上皮系細胞としては、上皮系細胞であれば特にその種類は限定されないが、好ましくは、内エナメル上皮細胞、外エナメル上皮細胞、エナメル髓細胞、中間層細胞、エナメル芽細胞、マラッセの上皮遺残細胞、口腔粘膜上皮細胞、上皮細胞、表皮細胞又はこれらの前駆細胞が挙げられる。これらの細胞は、1種類の上皮系細胞から成る単一の細胞として培養あるいは分離後移植してもよいし、2種類以上の上皮系細胞から成る細胞混合物として培養あるいは分離後移

植してもよい。

また、間葉系細胞としては、間葉系細胞であれば特にその種類は限定されないが、好ましくは、象牙芽細胞、歯髄細胞、歯乳頭細胞、歯嚢細胞、セメント芽細胞、骨芽細胞又はこれらの前駆細胞、又は間葉系の幹細胞等が挙げられる。これらの細胞は、1種類の間葉系細胞から成る単一の細胞として培養あるいは分離後移植してもよいし、2種類以上の間葉系細胞から成る細胞混合物として培養あるいは分離後移植してもよい。

上皮系細胞は、哺乳動物（例えば、ヒト、豚等）の歯胚、歯根膜（マラッセの上皮遺残）、口腔粘膜、付着上皮、皮膚等から公知の方法により採取することができる。例えば、内エナメル上皮細胞、外エナメル上皮細胞、エナメル髄細胞、中間層細胞、エナメル芽細胞等の上皮系細胞の場合、哺乳動物（例えば、ヒト、豚など）の下顎骨から採取することができる。埋伏歯を無菌的に取り出し、Hanks balanced salt solution (H B S S) 溶液などの適当な保存液で保存する。歯牙の中の石灰化した部分を取り除き、メスにて組織を小片にして、H B S S 溶液などを用いて組織を洗浄する。次いで、コラゲナーゼとディスパーゼを用いて組織を酵素処理することが好ましい。酵素処理後、ピペッティング操作と遠心操作により細胞を回収することができる。得られた細胞を、培地として、例えばM C D B 1 5 3 (k y o k u t o C o.) を用いて培養すると、歯胚中の間葉系細胞が失われ、上皮系細胞のみを得ることができる。

また、口腔粘膜上皮細胞の場合、ヒトより採取した口腔粘膜をディスパーゼで処理した後、上皮部分を剥がし、トリプシン処理することにより得ることができる。

間葉系細胞は、哺乳類（例えば、ヒト、豚など）の歯胚、歯髄、歯槽骨、骨髓等から公知の方法により採取することができる。例えば、歯胚中の間葉系細胞は、哺乳動物（例えば、ヒト、豚など）の下顎骨から採取することができる。埋伏歯を無菌的に取り出し、P B S 溶液又はH B S S 溶液などの適当な保存液で保存する。歯牙の中の石灰化した部分を取り除き、メスにて組織を小片にして、P B S

溶液又はHBSS溶液などを用いて組織を洗浄する。次いで、コラゲナーゼとデイスパーゼを用いて組織を酵素処理することが好ましい。酵素処理後、ピペッティング操作と遠心操作により細胞を回収することができる。得られた細胞を、培地として、Dulbecco's Modified Eagle Medium に10%牛胎児血清と1%抗生剤を添加したものを用いて継代培養すると、歯胚中の上皮系細胞が失われ、間葉系の細胞のみを得ることができる。

また、歯牙からの歯髓の摘出は、例えば About I., 他 Experimental cell research. 258. 33-41, 2000 に記載の方法に従って行うことができる。無菌的に採取した歯髓を、シャーレに移し、培地中で培養することにより、間葉系細胞を得ることができる。

更に、公知の方法に従い、腸骨等から骨髓穿刺を行って骨髓を採取し、培養することで間葉系の幹細胞を得ることができる。

本発明の方法に従って再生した骨は、患者（即ち、骨の欠損又は損傷を有する患者）に移植することにより、該患者の治療のために用いられる。この場合、移植に伴う生体適合性などの観点から、再生に用いる細胞は、該患者に由来する自分の細胞を用いることが好ましいが、同種（他家）の細胞を使用することも可能である。また、歯胚を構成する細胞あるいは歯胚に分化する細胞を使用する場合は、親知らず（智歯）からも採取することができる。

また、歯牙は、発生から成熟するまでに5つの段階を経て形成されることが知られている。第一期は、Initiation stage と呼ばれ、基底膜に上皮組織と間葉組織が誘導される。第二期は、Bud stage と呼ばれエナメル器が作られる。第三期はCap stage と呼ばれ、歯乳頭が形成され、歯胚が形成される。第四期はBell stage と呼ばれ、歯胚からエナメル質を形成する細胞への分化と歯乳頭から象牙質と歯髓を形成する細胞への分化が開始される。第五期はMaturation stage と呼ばれ、エナメル質と象牙質と歯髓などの歯牙を構成する組織へと分化する。本発明においては、これらのうちの好適な時期の細胞を採取して用いることができる。また、歯胚が存在していない症例では、歯根より歯髓を摘出して細胞を分離採取するこ

とができる。

細胞の培養は、動物細胞の培養に用いる通常の血清入り培地を用いて、通常の動物細胞の培養条件（例えば、室温から37℃の温度；5から10%CO₂インキュベーター内など）の下で行なうことができる。また、上皮系細胞の培養には、無血清培地を使用して培養することも可能であるし、繊維芽細胞等のフィーダー細胞を共存させて培養することも可能である。

本発明において細胞の培養は担体上で行ってもよいし、担体なしで培養してもよいが、細胞は担体上で培養されることが好ましい。担体の使用は、細胞から骨を形成するのに有用である。担体としては、骨の形成に必要とされる時間を耐久することができ、かつその後、速やかに吸収されるものが好ましい。即ち、皮下、胃大網又は顎骨内などの生体内において適切な吸収速度と特性を有し、かつ細胞と高い親和性を有する材料から成る担体を使用することが好ましい。

担体の素材は、上記特性を満たすものであれば特に限定されないが、例えば、ポリグリコール酸 (polyglycolic acid (PGA))、ポリ (DL-ラクチド-コ-グリコシド) (PLGA)、ポリ乳酸 (PLLA)、ポリカプロラクトンなどの合成高分子材料、またはコラーゲン、ゼラチン、フィブリンなどの蛋白質材料、あるいはヒアルロン酸及びその塩、アルギン酸及びその塩、象牙質、サンゴなどの天然由来材料を使用することもできる。さらに、リン酸三カルシウム (β -TCP) などの無機材料も使用することができる。

PGAは、例えば Albany International Research Co. などから購入することができ、また PLGA は Sigma から購入することができる。PGA の場合、吸収速度が速いため、ポリ (DL-ラクチド) (PLLA) を表面にコートして吸収期間を遅らせることもできる。さらに、PGA、PLLA、PLGA またはポリカプロラクトンなどの合成材料を使用する場合には、細胞の接着及び増殖性を高めるために、表面にコラーゲン溶液又はフィブロネクチン溶液等をコートして使用することもできる。

上記の担体の形態としては、メッシュ形態、スポンジ形態、ゲル形態、不織布

形態などが可能である。

担体は細胞を移植しやすい形状に加工したものが好ましく、板状、球状の多孔体あるいは中空で一端が開放されており、周囲から血管が進入しやすくなっているものが好ましい。

担体は、目的に適合した形態のものを作製することが好ましい。このためには、目的とする形態をレジンで作製した後に印象材を用いて型を取得する。その後、レジンの型を取り出し、担体を構成する合成材料を流しこむことによって目的の形態を再現することができる。

本発明の方法では、上皮系細胞及び間葉系細胞を培養した後に、該上皮系細胞及び間葉系細胞を移植動物に移植し、該移植動物の体内で骨を再生させてもよいし、該上皮系細胞及び間葉系細胞を直接患者の骨などに移植してもよい。好ましくは、細胞の培養の際に用いた担体も細胞と一緒に、移植動物の体内に移植される。

移植動物の種類は特に限定されないが、好ましくは哺乳動物であり、例えば、ラット（ヘアレスラットなど）、ウサギ又はマウスなどのげっ歯類動物を使用することができる。移植の部位としては、骨の形成に必要な因子を供給しやすい部位が好ましく、具体的には、血流の豊富な部位が好ましく、例えば、腹腔内の胃大網などが特に好ましい。このような部位に移植することにより、細胞の成長を促進することができ、骨の形成を早めることが可能となる。

上記した本発明による骨の再生方法により再生した骨（細胞を培養して得られる骨、あるいはこの骨を移植動物に移植し、該移植動物の体内でさらに再生させた骨の何れでもよい）は、骨の欠損又は損傷を有する患者に移植することによって、該患者を治療することができる。即ち、本発明による骨の再生方法により得られた骨を用いる患者の治療方法も本発明の範囲内のものである。患者に移植された後も骨の成長を継続させることにより、さらに骨を形成させることができる。

以下の実施例により本発明をさらに具体的に説明するが、本発明は実施例によって限定されるものではない。

実施例

比較例 1 : 歯胚間葉系細胞のみの移植

生後 6 ヶ月の新鮮豚から下顎骨を採取した。実験に使用するまでは 4℃の冷蔵庫にて保存し、運搬中は氷上にて保存した。埋伏歯を無菌的に取り出し、10% 抗生剤入り Phosphate Buffered Saline (PBS) 溶液にて保存した。

200PU/ml ディスパーゼを Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) 培地に溶解した酵素溶液を用いて、取り出した埋伏歯を 120 分間酵素処理した後、埋伏歯をメスにて上皮系細胞が含まれる組織と間葉系細胞が含まれる組織に分離した。分離したそれぞれの組織中の石灰化した部分を取り除き、メスにて組織を約 2mm の小片にし、PBS 溶液にて 5 回洗浄した。

2mg/ml コラゲナーゼを DMEM 培地に溶解した酵素溶液を用いて、洗浄した間葉系細胞が含まれる組織のみを 50 分間酵素処理した。得られた組織を 25ml 用のピペットにて 10 分間ピペッティングした。25ml の上澄み液を遠心分離 (1500rpm, 5 分) して細胞を回収した。得られた細胞を 10% 血清入り DMEM 培地にて 5 回洗浄した後に遠心分離することによって細胞を回収した。

回収した間葉系細胞を DMEM 培地にて 1.5×10^7 個/100 μ l の細胞懸濁液に調整し、PGA メッシュ担体 (体積密度 50% ~ 60 %, 厚さ 2mm、Albany International Research, MA, USA) に播種をした後、37℃、5%CO₂ 条件下で静置培養を 24 時間行った。

移植動物としては、ヌードラット F344 を用いた。ヌードラットの腹部皮膚切開後、大網を引き出し、間葉系細胞を播種した担体を大網で包み縫合し、筋層、皮膚を縫合した。

移植後 11 週にて試料を採取した。摘出した試料は、10%ホルマリン溶液にて固定し、常法に従ってパラフィンに包埋して連続組織切片を作成した。その後、切片にヘマトキシリン-エオジン染色を施し、組織学的に観察した。

移植後 11 週で摘出した移植体は、直径が約 3.5 mm の組織であった (図 1)。

また、ヘマトキシリンーエオジン染色した組織を観察した結果、硬組織形成はほとんど見られなかった（図2）。

比較例2：培養した歯胚間葉系細胞のみの移植

生後6ヶ月の新鮮豚から下顎骨を採取した。実験に使用するまでは4℃の冷蔵庫にて保存し、運搬中は氷上にて保存した。埋伏歯を無菌的に取り出し、10%抗生剤入りPBS溶液にて保存した。

200PU/ml ディスパーゼをDMEM培地に溶解した酵素溶液を用いて、取り出した埋伏歯を120分間酵素処理した後、埋伏歯をメスにて上皮系細胞が含まれる組織と間葉系細胞が含まれる組織に分離した。分離したそれぞれの組織中の石灰化した部分を取り除き、メスにて組織を約2mmの小片にし、PBS溶液にて5回洗浄した。

2mg/ml コラゲナーゼをDMEM培地に溶解した酵素溶液を用いて、洗浄した間葉系細胞が含まれる組織のみを50分間酵素処理した。得られた組織を25ml用のピペットを用いて10分間ピペッティングした。25mlの上澄み液を遠心分離（1500rpm, 5分）して細胞を回収した。得られた細胞を10%血清入りDMEM培地にて5回洗浄した後に遠心分離することによって細胞を回収した。

回収した細胞をDMEM培地にて37℃、5%CO₂条件下で培養を行い、必要な細胞数を獲得した。この細胞をトリプシンーEDTAを用いて細胞培養用フラスコから剥離した後、PGAメッシュ担体に播種をした。37℃、5%CO₂条件下で静置培養を24時間行った。

移植動物としては、KSN/slcヌードマウスを用いた。ヌードマウスの表皮を開いた後、筋層と表皮を剥離し、その空いたスペースに間葉系細胞を播種したPGAメッシュ担体を移植した。

移植後4週にて試料を採取した。摘出した試料は、10%ホルマリン溶液にて固定し、常法に従ってパラフィンに包埋して連続組織切片を作成した。その後、切片にヘマトキシリンーエオジン染色を施し、組織学的に観察した。

移植後 4 週で摘出した移植体のヘマトキシリン－エオジン染色した組織を観察した結果、硬組織形成はほとんど見られなかった（図 3）。

実施例 1：歯胚上皮系細胞と歯胚間葉系細胞の混合移植

生後 6 ヶ月の新鮮豚から下顎骨を採取した。実験に使用するまでは 4℃の冷蔵庫にて保存し、運搬中は氷上にて保存した。埋伏歯を無菌的に取り出し、10%抗生剤入り PBS 溶液にて保存した。歯胚の中の石灰化した部分を取り除き、メスにて組織を約 2mm の小片にし、PBS 溶液にて 5 回洗浄した。

2mg/ml コラゲナーゼを DMEM 培地に溶解した酵素溶液を用いて、洗浄した組織を 50 分間酵素処理した。得られた組織を 25ml 用のピペットにて 10 分間ピペッティングした。25ml の上澄み液を遠心分離（1500rpm, 5 分）して細胞を回収した。得られた細胞を 10%血清入り DMEM 培地にて 5 回洗浄した後に遠心分離することによって歯胚上皮系細胞及び歯胚間葉系細胞の混合細胞を回収した。

回収した混合細胞を DMEM 培地にて 1.5×10^7 個/100 μ l の細胞懸濁液に調整し、PGA メッシュ担体に播種をした。細胞を播種した担体は、静置培養を 24 時間行った。細胞の培養培地としては、DMEM に 10%牛胎児血清と抗生剤を加えたものを用いた。また、細胞の培養は、37℃、5%CO₂という条件下で行った。

移植動物としては、KSN/sl_c ノードマウスを用いた。ノードマウスの表皮を切開した後、筋層と表皮を剥離し、その空いたスペースに細胞を播種した PGA メッシュを移植した。

移植後 4 週にて試料を採取した。摘出した試料は、10%ホルマリン溶液にて固定し、常法に従ってパラフィンに包埋して連続組織切片を作成した。その後、切片にヘマトキシリン－エオジン染色を施し、組織学的に観察した。

移植後 4 週で摘出した移植体は、直径が約 10 mm の硬組織であった（図 4）。これは、比較例 1 で得られた間葉系細胞のみの場合の組織（ほとんど石灰化していない）に比較して顕著に大きいことが確認された。また、ヘマトキシリン－エオジン染色した組織を観察した結果、組織中には骨様組織の形成が確認された（図

5)。比較例 1 及び比較例 2 の結果からは硬組織の形成は認められておらず、また、これほど短期間に顕著な骨様組織の形成を観察した例はこれまで無いことから、上皮系細胞を添加したことにより、骨様組織の成長が促進されたものと考えられる。

実施例 2：歯胚上皮系細胞及び歯胚間葉系細胞を播き分けて移植

生後 6 ヶ月の新鮮豚から下顎骨を採取した。実験に使用するまでは 4℃の冷蔵庫にて保存し、運搬中は氷上にて保存した。埋伏歯を無菌的に取り出し、10%抗生剤入り PBS 溶液にて保存した。

200PU/ml ディスパーゼを DMEM 培地に溶解した酵素溶液を用いて、取り出した埋伏歯を 120 分間酵素処理した後、埋伏歯をメスにて上皮系細胞が含まれる組織と間葉系細胞が含まれる組織に分離した。分離したそれぞれの組織中の石灰化した部分を取り除き、メスにて組織を約 2mm の小片にした、PBS 溶液にて 5 回洗浄した。

2mg/ml コラゲナーゼを DMEM 培地に溶解した酵素溶液を用いて、洗浄したそれぞれの組織を 50 分間酵素処理した。得られた組織を 25ml 用のピペットを用いて 10 分間ピペッティングした。25ml の上澄み液を遠心分離 (1500rpm, 5 分) して細胞を回収した。得られた細胞を 10%血清入り DMEM 培地にて 5 回洗浄した後に遠心分離することによって歯胚上皮系細胞及び歯胚間葉系細胞を各々回収した。

回収した間葉系細胞を DMEM 培地にて 1.5×10^7 個/100 μ l の細胞懸濁液に調整し、PGA メッシュ担体に播種をした。

一方、回収した上皮系細胞をタイプ I コラーゲンにて作成した溶液 (37℃でゲル化する溶液) にて 1.5×10^7 個/100 μ l の細胞懸濁液に調整した。

細胞を播種した PGA メッシュ担体は、静置培養を 1 時間行った後、上皮系細胞が懸濁されたコラーゲン溶液にてコーティングを行い、静置培養を 1 時間行った。

その後、充分量の DMEM 培地を加え、静置培養を 24 時間行った。細胞の培養は、37℃, 5%CO₂ という条件下で行った。

移植動物としては、KSN/slc ノードマウスを用いた。ノードマウスの表皮を切開した後、筋層と表皮を剥離し、その空いたスペースに細胞を含むコラーゲンゲルにてコーティングを行った PGA メッシュ担体を移植した。

移植後 4 週にて試料を採取した。摘出した試料は、10%ホルマリン溶液にて固定し、常法に従ってパラフィンに包埋して連続組織切片を作成した。その後、切片にヘマトキシリン-エオジン染色を施し、組織学的に観察した。

移植後 4 週で摘出した移植体は、大きさが約 9 mm の硬組織であった (図 6)。これは、比較例 1 で得られた間葉系細胞のみの場合の組織 (ほとんど石灰化していない) に比較して顕著に大きいことが確認された。また、ヘマトキシリン-エオジン染色した組織を観察した結果、組織中には骨様組織の形成が確認された (図 7)。比較例 1 及び比較例 2 の結果からは硬組織の形成は認められておらず、また、これほど短期間に顕著な骨様組織の形成を観察した例はこれまで無いことから、上皮系細胞を添加したことにより、骨様組織の成長が促進されたものと考えられる。

実施例 3 : 歯胚間葉系細胞を口腔粘膜上皮細胞シートで包んで移植

生後 6 ヶ月の新鮮豚から下顎骨を採取した。実験に使用するまでは 4℃の冷蔵庫にて保存し、運搬中は氷上にて保存した。埋伏歯を無菌的に取り出し、10%抗生剤入り PBS 溶液にて保存した。

200PU/ml ディスパーゼを DMEM 培地に溶解した酵素溶液を用いて、取り出した埋伏歯を 120 分間酵素処理した後、埋伏歯をメスにて上皮系細胞が含まれる組織と間葉系細胞が含まれる組織に分離した。分離したそれぞれの組織中の石灰化した部分を取り除き、メスにて組織を約 2mm の小片にし、PBS 溶液にて 5 回洗浄した。

2mg/ml コラゲナーゼを DMEM 培地に溶解した酵素溶液を用いて、洗浄した間葉系細胞が含まれる組織のみを 50 分間酵素処理した。得られた組織を 25ml 用のピペットにて 10 分間ピペッティングした。25ml の上澄み液を遠心分離 (1500rpm, 5

分)して細胞を回収した。得られた細胞を 10%血清入り DMEM 培地にて 5 回洗浄した後に遠心分離することによってそれぞれの細胞を回収した。

回収した歯胚間葉系細胞を DMEM 培地にて 1.5×10^7 個/ $100 \mu\text{l}$ の細胞懸濁液に調整し、PGA メッシュ担体に播種をした後、 37°C 、 $5\%\text{CO}_2$ 条件下で静置培養を 1 時間行った。

ヒト口腔粘膜細胞を常法に従って培養することにより得られた口腔粘膜細胞シートにて歯胚間葉系細胞を播種した PGA メッシュを包み、24 時間静置培養を行った。細胞の培養は、 37°C 、 $5\%\text{CO}_2$ という条件下で行った。

移植動物としては、KSN/sl c ノードマウスを用いた。ノードマウスの表皮を切開した後、筋層と表皮を剥離し、その空いたスペースに口腔粘膜細胞シートにより PGA メッシュを覆った担体を移植した。

移植後 4 週にて試料を採取した。摘出した試料は、10%ホルマリン溶液にて固定し、常法に従ってパラフィンに包埋して連続組織切片を作成した。その後、切片にヘマトキシリン-エオジン染色を施し、組織学的に観察した。

移植後 4 週で摘出した移植体は、大きさが約 8 mm の硬組織であった (図 8)。これは、比較例 1 で得られた間葉系細胞のみの場合の組織 (石灰化はほとんどしていない) に比較して顕著に大きいことが確認された。また、ヘマトキシリン-エオジン染色した組織を観察した結果、組織中には骨様組織の形成が確認された (図 9)。比較例 1 及び比較例 2 の結果からは硬組織の形成は認められておらず、また、これほど短期間に顕著な骨様組織の形成を観察した例はこれまで無いことから、上皮系細胞を添加したことにより、骨様組織の成長が促進されたものと考えられる。

実施例 4：培養歯胚間葉系細胞と表皮細胞の混合移植

生後 6 ヶ月の新鮮豚から下顎骨を採取した。実験に使用するまでは 4°C の冷蔵庫にて保存し、運搬中は氷上にて保存した。埋伏歯を無菌的に取り出し、10%抗生剤入り PBS 溶液にて保存した。

200PU/ml ディスパーゼを DMEM 培地に溶解した酵素溶液を用いて、取り出した埋伏歯を 120 分間酵素処理した後、埋伏歯をメスにて上皮系細胞が含まれる組織と間葉系細胞が含まれる組織に分離した。分離したそれぞれの組織中の石灰化した部分を取り除き、メスにて組織を約 2mm の小片にし、PBS 溶液にて 5 回洗浄した。

2mg/ml コラゲナーゼを DMEM 培地に溶解した酵素溶液を用いて、洗浄した間葉系細胞が含まれる組織のみを 50 分間酵素処理した。得られた組織を 25ml 用のピペットを用いて 10 分間ピペッティングした。25ml の上澄み液を遠心分離 (1500rpm, 5 分) して細胞を回収した。得られた細胞を 10% 血清入り DMEM 培地にて 5 回洗浄した後に遠心分離することによって細胞を回収した。

回収した細胞を DMEM 培地にて 37°C、5%CO₂ 条件下で培養を行なった。この細胞をトリプシン-EDTA を用いて細胞培養用フラスコから剥離し、5×10⁶ 個の細胞を得た。

一方、フィッシャー系ラットの表皮細胞を常法に従って採取、培養し、表皮細胞シート (75cm² 培養用フラスコ 2 枚分) を得た。得られた細胞シートをトリプシン-EDTA を用いて剥離し、ピペッティングにより細胞懸濁液を得た。

前記培養歯胚間葉系細胞と表皮細胞を混合して懸濁し、PGA メッシュ担体に播種した後、37°C、5%CO₂ 条件下で静置培養を 24 時間行った。

移植動物としては、KSN/slc ノードマウスを用いた。ノードマウスの表皮を切開した後、筋層と表皮を剥離し、その空いたスペースに細胞を播種した PGA メッシュを移植した。

移植後 4 週にて試料を採取した。摘出した試料は、10%ホルマリン溶液にて固定し、常法に従ってパラフィンに包埋して連続組織切片を作成した。その後、切片にヘマトキシリン-エオジン染色を施し、組織学的に観察した。

移植後 4 週で摘出した移植体は、大きさが約 7 mm の硬組織であった (図 10)。これは、比較例 2 で得られた培養した歯胚間葉系細胞のみの場合の組織 (石灰化はほとんどしていない) に比較して顕著に大きいことが確認された。また、ヘマ

トキシリンーエオジン染色した組織を観察した結果、組織中には骨様組織の形成が確認された（図 1 1）。比較例 1 及び比較例 2 の結果からは硬組織の形成は認められておらず、また、これほど短期間に顕著な骨様組織の形成を観察した例はこれまで無いことから、上皮系細胞を添加したことにより、骨様組織の成長が促進されたものと考えられる。

産業上の利用可能性

本発明の方法によれば、骨を効果的に再生することができる。

請求の範囲

1. 上皮系細胞の共存下に間葉系細胞を培養することを含む、骨の再生方法。
2. 担体上で、上皮系細胞の共存下に間葉系細胞を培養することを含む、請求項1に記載の骨の再生方法。
3. 上皮系細胞の共存下に間葉系細胞を動物に移植し、該移植動物の体内で骨を再生させることを含む、骨の再生方法。
4. 上皮系細胞の共存下に間葉系細胞を担体と一緒に動物に移植し、該移植動物の体内で骨を再生させることを含む、請求項3に記載の骨の再生方法。
5. 上皮系の細胞として、内エナメル上皮細胞、外エナメル上皮細胞、エナメル髓細胞、中間層細胞、エナメル芽細胞、マラッセの上皮遺残細胞、口腔粘膜上皮細胞、上皮細胞、表皮細胞又はこれらの前駆細胞、間葉系細胞として、象牙芽細胞、歯髓細胞、歯乳頭細胞、歯嚢細胞、セメント芽細胞、骨芽細胞又はこれらの前駆細胞、又は間葉系の幹細胞を使用する、請求項1から4に記載の骨の再生方法。
6. 再生する骨が、顎骨もしくは歯槽骨である、請求項1から5に記載の骨の再生方法。
7. 請求項1から6の何れかに記載の方法により再生された骨。
8. 請求項1から6の何れかに記載の方法により再生した骨を、骨の欠損又は損傷を有する患者に移植することを含む、治療方法。
9. (1) 内エナメル上皮細胞、外エナメル上皮細胞、エナメル髓細胞、中間層細胞、エナメル芽細胞、マラッセの上皮遺残細胞、口腔粘膜上皮細胞、上皮細胞、表皮細胞又はこれらの前駆細胞から選択される上皮系細胞；
(2) 象牙芽細胞、歯髓細胞、歯乳頭細胞、歯嚢細胞、セメント芽細胞、骨芽細胞又はこれらの前駆細胞あるいは間葉系の幹細胞から選択される間葉系細胞；及び
(3) 担体；

を含む、骨再生用組成物。

図 1

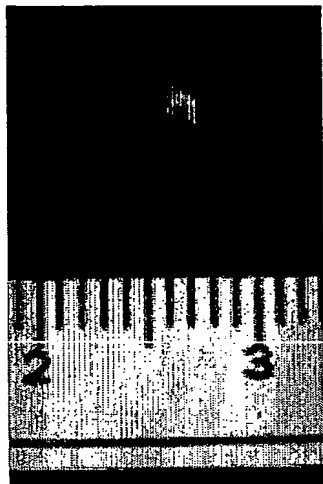


図 2

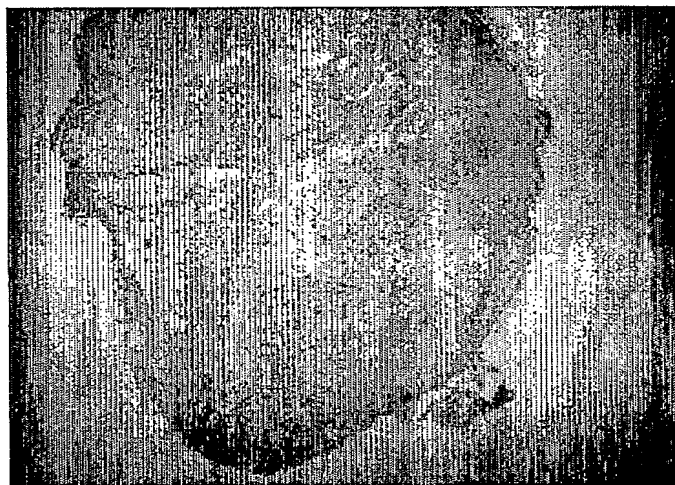


図 3

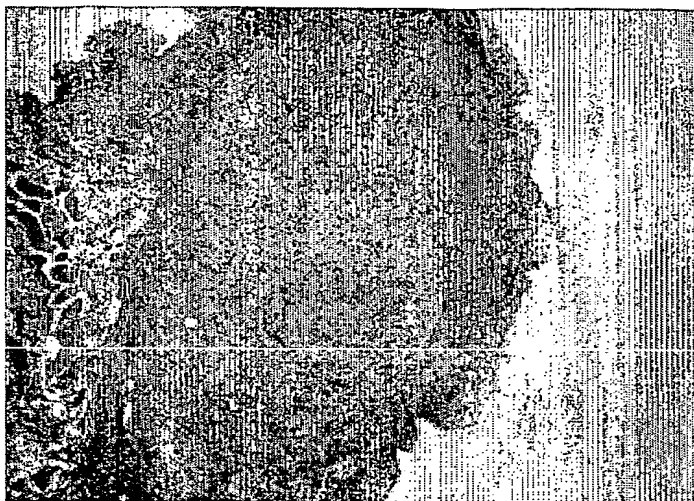


図 4

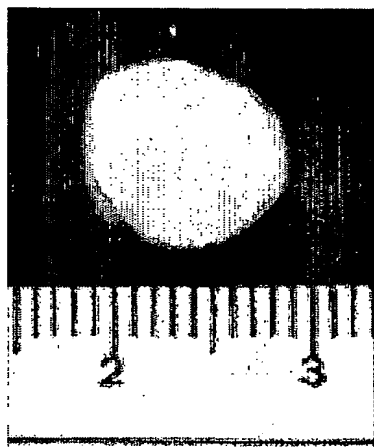


図 5

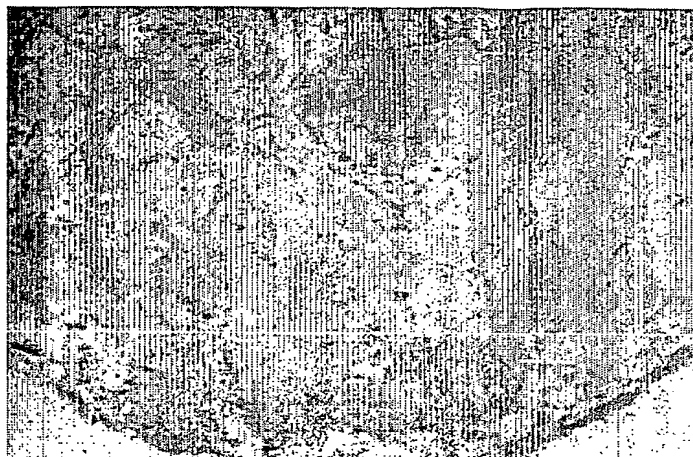


図 6

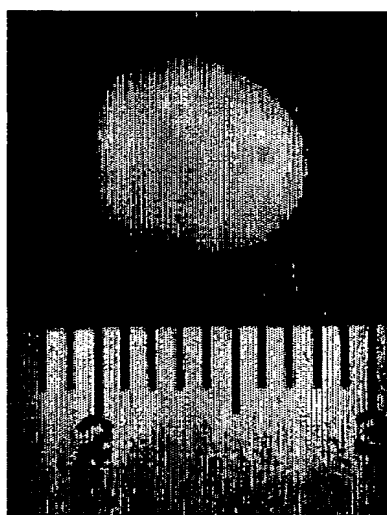


図 7

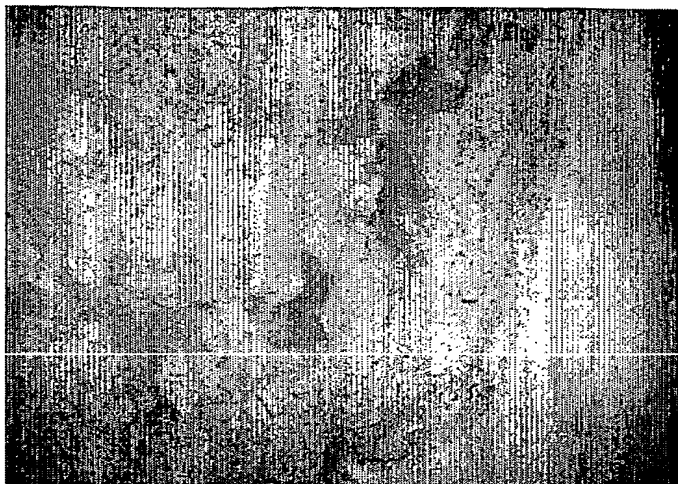


図 8

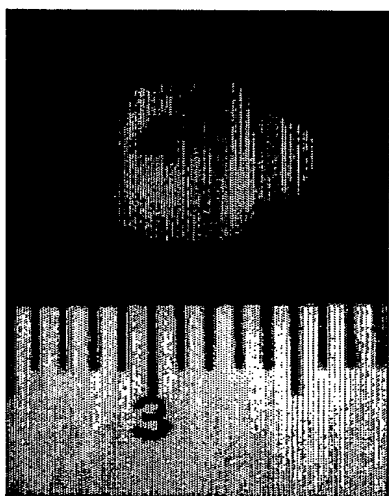


図 9

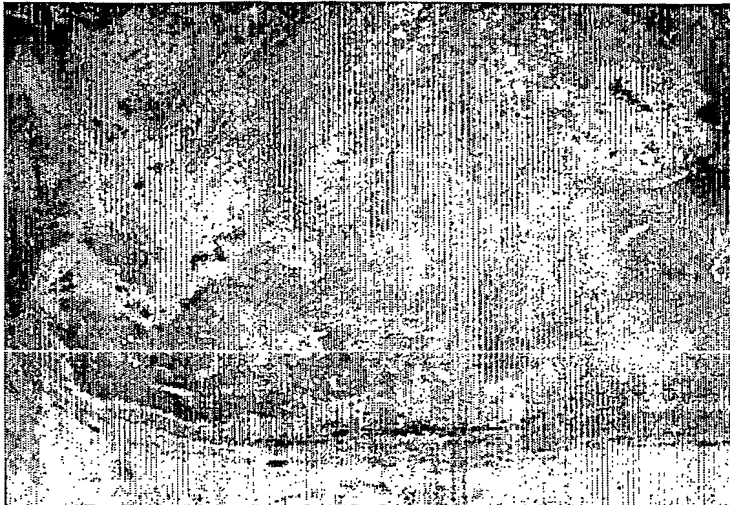


図 10

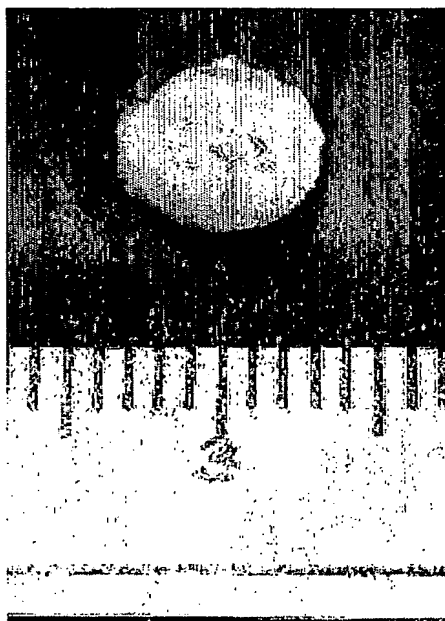
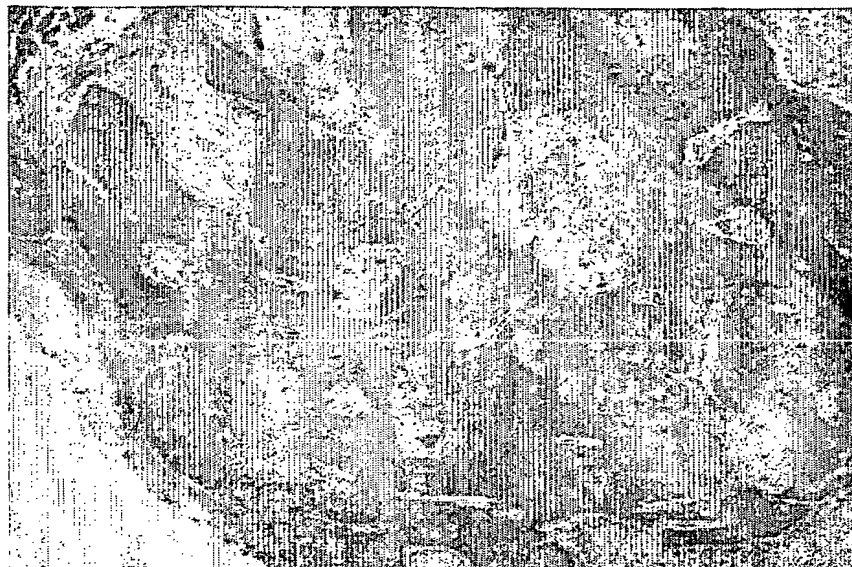


図 1 1



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/011740

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ A61L27/00, C12N5/06

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ A61L27/00, C12N5/06

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
MEDLINE/CAPLUS/EMBASE/BIOSIS (STN), JSTPLUS/JMEDPLUS (JOIS)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	ISHIZEKI K, 'In Vitro Characterization of Enamel Epithelium and Pulp Cells in Mouse Tooth Germs.', Acta Anat Nippon, 71(4), 294-307, 1996.08 (ISSN: 0022-7722)	1 2, 9
A	Takashi INOUE et al., 'Shikonmaku Sen'iga Saibo to Malassez Johi Izan Yurai Johi Saibo no Kongo Baiyo ni Okeru Saibo Dotai no Kenkyu', Japanese Association for Oral Biology Zasshi, 37(5), 356-364, 1995.10, [Japanese] (ISSN: 0385-0137)	1, 2, 9
A	JP 10-052260 A (Toyobo Co., Ltd.), 24 February, 1998 (24.02.98), Full text (Family: none)	1, 2, 9

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
15 September, 2004 (15.09.04)

Date of mailing of the international search report
05 October, 2004 (05.10.04)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/011740

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2002-502822 A (OREGON HEALTH SCIENCES UNIVERSITY), 29 January, 2002 (29.01.02), Claims 1, 6 & WO 99/39724 A1	2, 9
P, X	JP 2004-201612 A (Minoru UEDA), 22 July, 2004 (22.07.04), Full text (Family: none)	1, 2, 9

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/011740

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 3-8
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
"Animals" set forth in claims 3 to 8 involve "humans" and the claims are deemed to be concerned with methods for treatment of the human body by therapy and thus relate to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions of (continued to extra sheet.)
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/011740

Continuation of Box No.II-1 of continuation of first sheet(2)

Article 17(2) (a) (i) of the PCT and Rule 39.1(iv) of the Regulations under the PCT, to search.

<Subject of search>

In claims 1, 2 and 9, the "epithelial cells" and "mesenchymal cells" are interpreted as covering various cells. However, it appears that only the cases where "dental mesenchymal cells" are used as the "mesenchymal cells" are supported by the disclosure in the description within the meaning of PCT Article 6, taking into account that in the Examples, "dental mesenchymal cells" are used as the "mesenchymal cells" without exception and that as described in the references 2 and 3, etc., cases where any osteoid tissue is not formed even when "epithelial cells" and "mesenchymal cells" are cultured in combination are already known.

Therefore, search has been conducted on the scope supported by the disclosure in the description, namely, with a focus placed on the cases where "dental mesenchymal cells" are used as the "mesenchymal cells".

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ A61L27/00, C12N5/06

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ A61L27/00, C12N5/06

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

MEDLINE/CAPLUS/EMBASE/BIOSIS(STN) JSTPLUS/JMEDPLUS(JOIS)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X Y	ISHIZEKI K, 'In Vitro Characterization of Enamel Epithelium and Pulp Cells in Mouse Tooth Germs.' Acta Anat Nippon, 71(4), 294-307, 1996.08 (ISSN: 0022-7722)	1 2, 9
A	井上孝 ら, '歯根膜線維芽細胞とマラッセ上皮遺残由来上皮細胞の混合培養における細胞動態の研究', 歯科基礎医学会雑誌, 37(5), 356-364, 1995.10 [Japanese] (ISSN: 0385-0137)	1, 2, 9
A	J P 10-052260 A (東洋紡績株式会社) 1998.02.24, 全文, (ファミリーなし)	1, 2, 9

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

15.09.2004

国際調査報告の発送日

05.10.2004

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

川口 裕美子

4C

9829

電話番号 03-3581-1101 内線 3452

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	J P 2002-502822 A (オレコソヘルスサイエンス エンバージュ) , 2002. 01. 29 請求項1, 6 & WO 99/39724 A1	2, 9
P, X	J P 2004-201612 A (上田 実) 2004. 07. 22, 全文, (ファミリーなし)	1, 2, 9

第II欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項(PCT17条(2)(a))の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 3-8 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
つまり、
請求の範囲3-8の「動物」は「人間」を含むものであり、治療による人体の処置方法に関するものであると認められる。したがって、PCT第17条(2)(a)(i)及びPCT規則39.1(iv)の規定により、この国際調査機関が国際調査を行うことを要しない対象に係るものである。
2. ☐ 請求の範囲 は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

<調査の対象について>

請求の範囲1, 2, 9においては、「上皮系細胞」及び「間葉系細胞」として、種々の細胞を含むと解される。しかしながら、実施例においては、すべて「間葉系細胞」として「歯胚間葉系細胞」を用いていること、及び、文献2, 3などに記載されているように、「上皮系細胞」及び「間葉系細胞」を組み合わせで培養しても、骨様組織とはならない例が既に知られていること、考慮すると、PCT第6条の意味において明細書の開示により裏付けられているのは、「間葉系細胞」として「歯胚間葉系細胞」を用いた場合のみと認められる。

よって、調査は、明細書の開示により裏付けられている範囲、すなわち、「間葉系細胞」として「歯胚間葉系細胞」を用いたものを中心として行った。

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☒ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINE(S) OR MARK(S) ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER: _____**

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.